

FACULTÉ DE MÉDECINE DE PARIS

ANNEE 1963

N°

72

THÈSE

POUR LE

DOCTORAT EN MÉDECINE

DIPLOME D'ÉTAT

PAR

Georges CASTILLO

né le 21 décembre 1924 à Crépy en Valois (Oise)

Présentée et soutenue publiquement le :

ETUDE CRITIQUE DU DOSAGE PHOTO-COLORIMETRIQUE DE
L'ACIDE URIQUE DU SANG PAR LE REACTIF DE FOLIN ET DENIS

Président : M. R. FAUVERT, Professeur.

EDITIONS A. G. E. M. P. — 8, RUE DANTE . PARIS.V

THE ...
... of ...

... ..

... ..
... ..

... ..

FACULTÉ DE MÉDECINE DE PARIS

ANNEE 1963

N°

THÈSE

POUR LE

DOCTORAT EN MÉDECINE

DIPLOME D'ÉTAT

PAR

Georges CASTILLO

né le 21 décembre 1924 à Crépy en Valois (Oise)

Présentée et soutenue publiquement le :

ETUDE CRITIQUE DU DOSAGE PHOTO-COLORIMETRIQUE DE
L'ACIDE URIQUE DU SANG PAR LE REACTIF DE FOLIN ET DENIS

Président : M. R. FAUVERT, Professeur.

EDITIONS A. G. E. M. P. — 8, RUE DANTE . PARIS-V

PROFESSEURS HONORAIRES :

MM. Alajouanine (T.), Aubin (A.), Bénard (H.), Bulliard (H.), Cadenat (F.), Chabrol (E.), Champy (C.), Debré (R.), Fey (B.), Gastinel (P.), Halphen (E.), Hazard (R.), Heuyer (G.), Lantuejoul (P.), Laroche (G.), Lévy-Solal (E.), Lian (C.), Mathieu (P.), Mocquot (P.), Mondor (H.), Monod (R.), Moreau (R.), Moulonguet (P.), Olivier (E.), Pasteur Valléry-Radot, Petit-Dutaillis (D), Quénu (J.), Richet (C.), Senèque (J.), Strohl (A.), Tanon (L.).

DOYEN Léon BINET.

Membre de l'Institut

1^{er} ASSESSEUR } Jean VERNE

2^e ASSESSEUR } Gaston CORDIER

I. — PROFESSEURS

1° CHAIRES DE SCIENCES FONDAMENTALES

a) Professeurs titulaires :

	MM.
Anatomie	DELMAS (A.)
Anatomie pathologique	DELARUE (J.)
Anesthésiologie	BAUMANN (J.)
Biochimie médicale	{ JAYLE (M.-F.)
	{ SCHAPIRA (G.)
Biologie appliquée à l'Education physique et aux Sports	CHAILLEY-BERT (P.)
Biologie médicale	FAUVERT (R.)
Cancérologie médicale et sociale	BERNARD (J.)
Embryologie	GIROUD (A.)
Histoire de la médecine et de la chirurgie (Lariboisière)	N...
Histologie	VERNE (J.)
Hygiène et médecine préventive	JOANNON (P.)
Médecine du Travail	DESOLLE (H.)
Médecine légale	PIEDELIEVRE (R.)
Microbiologie (Bactériologie et virologie)	FASQUELLE (R.)
Parasitologie	GALLIARD (H.)
Pathologie chirurgicale	HUGUIER (J.)
Pathologie exotique	LAVIER (G.)
Pathologie expérimentale et comparée	MERKLEN (F.-P.)
Pathologie médicale	MILLIEZ (P.)
Pathologie respiratoire	TURIAF (J.)
Pathologie et thérapeutique générales	BOUDIN (G.)
Pharmacologie	CHEYMOL (J.)
Physiologie	{ BINET (L.)
	{ BARGETON (D.)
Physiologie et pathologie obstétricale	LEPAGE (F.)
Physique médicale	{ DOGNON (A.)
	{ DJOURNØ (A.)
Radiologie médicale	DESGREZ (H.)
Technique chirurgicale et Chirurgie expérimentale	N...
Thérapeutique	CONTE (M.)

b) Professeurs à titre personnel :

Biochimie médicale	{ DESGREZ (P.)
	{ POLONOVSKI (J.)
Biologie médicale	BOURLIÈRE (F.)
Embryologie	TUCHMANN (H.)
Hygiène et médecine préventive	DEPARIS (M.)
Parasitologie	BRUMPT (L.-C.)
Pathologie chirurgicale	LAURENCE (G.)
Pharmacologie	LÉVY (M ^{lle} J.)
Physiologie	PARROT (J.)
Physique médicale	KELLERSHOHN (L.)

a) Professeurs titulaires :

MM.

Clinique carcinologique chirurgicale (Necker)	REDON (H.)
Clinique cardiologique (Broussais)	MOUQUIN (M.)
Cliniques chirurgicales	Beaujon LORTAT-JACOB (J.-L.)
	Cochin LEGER (L.)
	Hôtel-Dieu PATEL (J.)
	Pitié CORDIER (G.)
	Saint-Antoine GOSSET (J.)
Salpêtrière	SICARD (A.)
	Tenon OLIVIER (Cl.)
Clinique de chirurgie infantile et orthopédique (Enfants Malades)	FÈVRE (M.)
Clinique chirurgicale orthopédique et réparatrice (Cochin)	MERLE d'AUBIGNÉ (R.)
Clinique de chirurgie cardio-vasculaire (Broussais)	GAUDART d'ALLAINES (F. de)
Clinique de chirurgie pleuro-pulmonaire (Laennec)	MATHEY (J.)
Clinique endocrinologique (Pitié)	DECOURT (J.)
Clinique de Génétique médicale (Enfants-Malades)	LAMY (M.)
Clinique gynécologique (Broca)	FUNCK-BRENTANO (P.)
Clinique des maladies cutanées et syphilitiques (Saint-Louis)	DEGOS (R.)
Clinique des maladies des Enfants (Enfants-Malades)	CATHALA (J.)
Clinique des maladies infectieuses (Claude-Bernard)	MOLLARET (P.)
Clinique des maladies mentales et de l'encéphale (Sainte-Anne)	DELAY (J.)
Clinique des maladies métaboliques (Necker)	HAMBURGER (J.)
Clinique des maladies du sang (Broussais)	MARCHAL (G.)
Clinique des maladies du système nerveux (Salpêtrière)	CASTAIGNE (P.)
Cliniques médicales	Boucicaut LENÈGRE (J.)
	Broussais SOULIÉ (P.)
	Cochin JUSTIN-BESANÇON (L.)
	Cochin BROUET (G.)
	Hôtel-Dieu BARIÉTY (M.)
	Lariboisière SÈZE (S. de)
Pitié	DREYFUS (G.)
	Saint-Antoine KOURILSKY (R.)
Clinique médicale d'hydrologie thérapeutique et climatologie (Bichat)	DEBRAY (C.)
Clinique médicale propédeutique (Broussais)	GENNES (L. de)
Clinique médico-sociale du diabète sucré et des maladies de la nutrition (Hôtel-Dieu)	DEROT (M.)
Clinique de neuro-chirurgie (Pitié)	DAVID (M.)
Clinique neurologique (Salpêtrière)	GARCIN (R.)
Cliniques obstétricales	Baudelocque LACOMME (M.)
	Foch (Suresnes) MERGER (R.)
Clinique obstétricale et gynécologique (Port-Royal)	VARANGOT (J.)
Clinique ophtalmologique (Hôtel-Dieu)	RENARD (G.)
Clinique oto-rhino-laryngologique (Lariboisière)	AUBRY (M.)
Clinique de pédiatrie et de puériculture (Saint-Vincent-de-Paul)	LELONG (M.)
Clinique de pédiatrie sociale (Enfants-Malades)	MARIE (J.)
Clinique de pneumo-phthisiologie (Laennec)	BERNARD (E.)
Clinique de neuro-psychiatrie infantile (Salpêtrière)	MICHAUX (L.)
Clinique de rhumatologie médicale et sociale (Cochin)	COSTE (F.)
Clinique stomatologique (Pitié)	DECHAUME (M.)
Clinique thérapeutique chirurgicale (Vaugirard)	ROUX (M.)
Clinique thérapeutique médicale (Saint-Antoine)	LEMAIRE (A.)
Clinique toxicologique	GAULTIER (M.)
Clinique traumatologique	PADOVANI (P.)
Sémiologie médicale	DONART (A.)
Sémiologie et clinique chirurgicales	POILLEUX (F.)
Clinique urologique (Necker)	COUVELAIRE (R.)
Hygiène et clinique de la première enfance (Trousseau)	TURPIN (R.)

b) Professeurs à titre personnel :

Médecine	BOUR (H.)
	LHERMITTE (F.)
	PEQUIGNOT (H.)

II. — PROFESSEURS SANS CHAIRE, PROFESSEURS AGRÉGÉS ET MAÎTRES DE CONFÉRENCES - AGRÉGÉS

	MM.		MM.
Anatomie	CABROL (C.) COUINAUD (C.) GILLOT (G.) OLIVIER (G.)	Orthopédie	JUDET (R.) MEARY (R.) POSTEL (M.) RAMADIER (J.)
Anatomie pathologique	GAUTHIER-VILLARS (Mlle P.) pr. s. ch. ABELANET (R.) BUSSE (F.) CHOMETTE (G.) GOUYCOU (Ch.), m. conf. NEZELOFF (Ch.) ORCEL (L.) PAILLAS (J.)	Oto-rhino-Laryngologie	DEBAIN (J.) PIALOUX (P.)
Anesthésiologie	KERN (E.) VOURC'H (G.)	Parasitologie	GOLVAN (Y.) LAPIERRE (J.)
Bactériologie	BARBIER (P.) CHRISTOL (D.) LE MINOR (L.) TOURNIER (P.)	Pathologie chirurgicale	BARCAT (J.) BINET (J.-P.) CAUCHOIX (J.) GERBONNET (G.) CHATELIN (C.-L.) DUBOST (Ch.) DUBOST (Cl.) FAUREL (J.) FLABEAU (F.) GARBAY (M.) GARNIER (H.) (Cl. de) GAUDART-d'ALLAINES GERMAIN (A.) LATASTE (J.) LEVEQUE (B.) LOYGUE (J.) MERCADIER (M.) NATALI (J.) PELLERIN (D.) PERROTIN (J.) ROBERT (H.) THOMERET (G.)
Biochimie médicale	BAULIEU Et. m. conf. BOURILLON (R.) CARTIER (P.) DREYFUS (J.-Cl.) GONNARD (P.) KRUIH (J.) JEROME (H.)	Pathologie exotique	SCHNEIDER (J.)
Biologie appliquée à l'Éducation Physique et aux Sports	PLAS (F.)	Pathologie expérimentale	BENHAMOU (J.-P.) BERTHAUX (P.) BOIVIN (P.) CROSNIER (J.) HARTMANN (L.) LŒPER (J.) MAURICE (J.) MIKOL (Cl.) RICHEL (G.) AUSSANNAIRE (M.) BOUVIER (J.) BOUVRAIN (Y.) BRICAIRE (H.) BRISAUD (H.) BROCARD (H.) BUGE (A.) CATINAT (J.) CHRÉTIEN (J.) COBLENTZ (B.) CONTAMIN (F.) COURY (C.) ÉTIENNE (J.-P.) FREZAL (J.) FRITEL (D.) HENNEQUET (A.) HIMBERT (J.) HOUSSET (E.) LAROCHÉ (Cl.) LESOBRE (R.) MACREZ (C.) MOREAU (L.) NICK (J.) ROYER (P.) TOURNEUR (R.) WOLFROMM (R.)
Carcinologie	BOIRON (M.) DENOIX (P.) MATHE (G.) SELIGMANN (M.)	Pathologie médicale	JOSEPH (R.) LAFOURCADE (J.) LEPERCQ (G.) MANDE (R.) MOZZIGRACCI (P.) POLONOVSKI (C.) ROSSIER (A.) VIALATTE (J.)
Dermato-Syphiligraphie	GIVATTE (J.) DUPERRAT (B.)		
Electro-Radiologie	LEDoux-LEBARD (G.)		
Hématologie	BESSIS (M.) BILSKI-PASQUIER (G.) DAUSSET (J.) DUHAMEL (G.)		
Histologie	COUJARD (R.), pr. s. ch. MAROIS (M.) RACADOT (J.)		
Hydrologie	BESANÇON (F.) CORNET (A.)		
Hygiène	BOYER (J.) pr. s. ch. BLANCHER (G.) CORRE-HURST (Mlle L.) SAPIN-JALOUSTRÉ (H.)		
Maladies infectieuses	BASTIN (R.) DUPONT (V.)		
Médecins légals	DEROBERT (L.), pr. s. ch. FOURNIER (E.) GUENIOT (M.) HADENGUE (A.)		
Médecine du travail	ALBANARY (C.)		
Neuro-chirurgie	PERTUISET (B.)		
Obstétrique	GRANJON (A.) HERVET (E.) LE LORIER (G.) LEVY (J.) MORIN (P.) MUSSET (R.) ROBEY (M.) SENEZE (J.) SUREAU (C.) THOYER-ROZAT (J.)		
Ophtalmologie	BRÉGEAT (P.) DUBOIS (A.) SARAUX (H.)		

	MM.		MM.
Pharmacologie	BOISSIER (J.) LECHAT (P.) BARRES (G.) DEJOURS (P.) DURAND (J.)	Psychiatrie	PICHOT (P.)
Physiologie	GIRARD m. conf. HUGELIN (A.) SCHERRER (J.) CHANTEUR (J.) GOUGEROT (L.), m. conf. pr. s. ch.	Psychiatrie infantile	DENIKER (P.) DUCHE (D.) FLAVIGNY (H.) LAPRESLE (J.)
Physique médicale	GREMY (F.) m. conf. MILHAUD (G.) PELLERIN (P.) ROUCAYROL (J.-Cl) TUBIANA (M.) m. conf.	Rhumatologie	DELBARRE (F.)
Pneumo phthisiologie	KREIS (B.) MEYER (A.) RENAULT (P.)	Stomatologie	CERNEA (P.) CHAPUT (M ^{me} A.) m. c. agr. GRELLET (M.)
		Thérapeutique	CHASSAGNE (P.) LAMOTTE (M.) MARCHE (J.)
		Urologie	AUVERT (J.) MOULONGUET (A.) QUENU (L.)

III. — PROFESSEURS SANS CHAIRE ET AGRÉGÉS CHARGÉS DE COURS DE CLINIQUE ANNEXE à titre permanent.

	MM.		MM.
Anatomie	DEBEYRE (J.)	Clinique ophtalmologique	DESIGNES (P.) OFFRET (G.)
Clinique chirurgicale	ABOULKER (P.) AMELINE (A), pr. s. ch. VERNE (J.-M.)	Clinique oto-rhino-laryngo- logique	MADURO (R.)
Clinique médicale	PERRAULT (M.) RAMBERT (P.) THIEFFRY (S.)	Clinique pédiatrique et pué- riculture	LAPLANE (R.)
Clinique obstétricale	GRASSET (J.) MAYER (M.)	Clinique psychiatrique	BARUK (H.)
		Clinique urologique	KUSS (R.)

IV. — PROFESSEURS DÉTACHÉS DANS LES UNIVERSITÉS ÉTRANGÈRES

Bactériologie	HAUDUROY (P.) Pr. s. ch.
Pathologie chirurgicale	RUDLER (J.) Pr. s. ch.

V. - CHARGÉS DE COURS D'HYGIÈNE SCOLAIRE ET UNIVERSITAIRE	BOLTANSKI (E.) LAUNAY (C.)
Secrétaire général de la Faculté	M. LENA (J.)
Secrétaire principal	Mlle CHAINTREUIL (G.)
Conservateur en Chef de la Bibliothèque	M. le Docteur HAHN (A.)
Conservateur du Musée d'Histoire de la Médecine	
Conservateur	Mlle DUMAITRE (P.)
Bibliothécaires	Mmes CONTET (J.), FORGET (F.), Miles LAURENT (H.), LE NOIR (G.), QUIÉVREUX (E.)

Par délibération en date du 9 décembre 1798, l'Ecole a arrêté que les opinions émises dans les dissertations qui lui seront présentées, doivent être considérées comme propres à leurs auteurs et qu'elle n'entend leur donner aucune approbation ni improbation.

A mes Parents

A Monsieur le Docteur André RAVINA

Médecin Honoraire des Hôpitaux de Paris

qui a bien voulu depuis longtemps
s'intéresser à ma famille.



Digitized by the Internet Archive
in 2026

https://archive.org/details/IA40152008_0022

A Monsieur Pierre AMBERT

qui a guidé de ses conseils mes premiers pas pratiques dans la Biologie

A Monsieur le Professeur FAUVERT

A Monsieur le Professeur HARTMANN

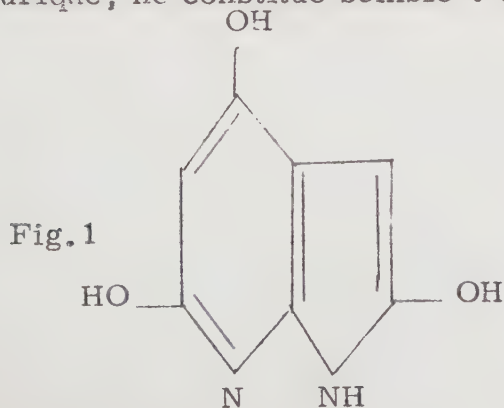
qui ont bien voulu considérer ce travail
avec intérêt.

INTRODUCTION

L'acide urique ou tri-hydroxy-purine, est le produit de l'oxydation de tous les dérivés puriques, provenant eux-mêmes du catabolisme des acides nucléiques. Les bases puriques sont d'abord désaminées et transformées en monophénols (hypoxanthine), si elles sont porteuses d'une seule fonction amine (adénine), ou en diphénols (xanthine), s'il s'agit de diamines (guanine). Une nouvelle oxydation les transforme ensuite en triphénol (acide urique), avec passage par le stade intermédiaire de diphénol, pour l'hypoxanthine.

Chez l'Homme et les Primates, la dégradation des nucléoprotéines s'arrête là et l'acide urique est éliminé tel quel par le rein : d'où le nom d'uricotéliques qui leur est donné. Les autres mammifères possèdent un enzyme spécifique, l'uricase, transformant l'acide urique en allantofine, qu'on retrouve alors dans leur urine : ce sont les allantofinotéliques, mixtes ou purs, selon qu'ils éliminent ou n'éliminent pas conjointement de l'acide urique. Le chien de Dalmatie dont l'urine contient de fortes quantités d'acide urique, ne constitue semble-t-il, qu'une exception apparente à cette règle :

il posséderait dans ses tissus autant d'uricase que les autres chiens, mais sa perméabilité rénale pour l'acide urique serait telle, que celui-ci serait éliminé avant même que d'avoir pu être



métabolisé. Il convient toutefois de noter que l'Homme et les Primates éliminent aussi de faibles quantités d'allantoïne, par suite d'une discrète dégradation non spécifique de l'acide urique.

Au fur et à mesure qu'on descend l'échelle de l'évolution, le catabolisme des nucléoprotéines est de plus en plus poussé. Certaines espèces possèdent une allantoïnase transformant l'allantoïne en acide allantoïque, d'autres espèces encore plus primitives produisent une allantoïcase dégradant l'acide allantoïque en urée, et vont même parfois, jusqu'à transformer celle-ci en ammoniacque.

CHAPITRE I

GENERALITES SUR LES METHODES DE DOSAGE DE L'ACIDE URIQUE DANS LE SANG.

Le dosage de l'acide urique dans le sang, est réalisé par plusieurs méthodes reposant toutes sur le même principe de son oxydation, les uns par voie chimique ordinaire, les autres par voie enzymatique.

Les méthodes chimiques les plus anciennement connues appartiennent à deux types présentant naturellement de nombreuses variantes, dont nous envisagerons seulement les plus utilisées en France.

D'une très ancienne réaction utilisée pour caractériser l'acide urique en milieu alcalin en raison de la couleur bleue produite, FOLIN et DENIS (7), par la préparation d'un réactif à la fois plus sensible et plus spécifique qui porte leur nom, ont permis à leurs successeurs de tirer diverses techniques quantitatives. La variante généralement utilisée en France est due initialement à GRIGAUT (10), et modifiée par LAUDAT (12). C'est cette modification qui est présentée dans les fiches de FLEURY (6), dont on connaît la large audience. Le mécanisme de cette réaction, d'ailleurs assez mal élucidé, serait le suivant : l'acide urique réduirait l'acide phosphotungstique du réactif de FOLIN et DENIS, la réduction de cet acide donnant alors naissance à un composé bleu en milieu alcalin.

Les diverses modalités du précédent procédé n'ayant pas tardé à faire l'objet de critiques nombreuses, on s'est efforcé de réaliser d'autres

méthodes utilisant une oxydation de l'acide urique par le ferricyanure de potassium en excès, cet excès étant ensuite dosé par des moyens variés. La technique utilisée dans notre pays a été codifiée par DELAVILLE et LESCA-ROUX (4) : l'acide urique est au préalable précipité par le lactate d'argent, l'excès de ferricyanure étant ensuite dosé par une solution d'indigosulfonate de sodium qui sert en même temps d'indicateur coloré.

Ce dernier procédé chimique ne s'étant pas non plus trouvé à l'abri des critiques, on eut en dernier lieu l'idée de recourir à l'oxydation enzymatique, rendue possible par la préparation d'une uricase suffisamment purifiée. Cette méthode très séduisante, dont une variante est proposée par MM. FAUVERT et HARTMANN (5), d'après PRAETORIUS, est basée sur la propriété que possède l'acide urique, d'absorber les radiations ultra-violettes de 293 millimicrons de longueur d'onde : il suffit de mesurer l'absorption avant et après action de l'uricase sur le sérum, sans défécation des protéines, la différence étant proportionnelle à la quantité d'acide urique contenue avant le traitement par l'enzyme.

Malgré sa facilité et sa spécificité absolue, cette méthode n'est pas sans présenter un inconvénient qui en limite considérablement la diffusion. Elle exige en effet un appareillage spécial (spectrophotomètre UV) et coûteux qui n'est présentement utilisé en pratique courante, pour aucune autre technique. Il n'y a donc pas lieu de s'étonner que la possession de tels appareils soit à peu près réservée à quelques laboratoires de recherche, ou laboratoires centraux hospitaliers. L'avenir entraînera peut-être une modification de cet état de choses par l'utilisation de plus en plus fréquente du spectre invisible, mais nous n'apprendrons assurément à personne que le propre de l'avenir est de ne pas encore être advenu.

La méthode de DELAVILLE au ferricyanure est aussi une méthode spécifique, puisque la précipitation préalable de l'acide urique à l'état d'urate d'argent permet de se débarrasser d'autres substances présentes dans le sang, et susceptibles de réduire le réactif de FOLIN, mais il s'agit là d'une technique longue et complexe, peu propre aux dosages en série. On a aussi

reproché aux techniques de ce type, d'entraîner une perte d'acide urique par précipitation incomplète, et UZAN (15), a été amené à en proposer quelques modifications dans le but de pallier des "irrégularités parfois observées", modifications qui ont aussi pour effet de la rendre encore plus fastidieuse.

Néanmoins les critiques dont ces deux méthodes peuvent faire l'objet ne sont rien à côté de celles dont on a accablé les techniques colorimétriques: non spécificité, non proportionnalité de la coloration à la quantité d'acide urique, etc... Donc en un mot, absence de rapport entre les résultats trouvés et la quantité réelle d'acide urique. Malgré ce défaut qu'on peut effectivement considérer comme capital, il s'agit là de techniques simples et rapides, ne nécessitant aucune installation spéciale, et nous avons pensé qu'elles mériteraient d'être soumises à une étude systématique et complète, à l'aide d'un appareillage moderne qui objectiverait ce qui se passe dans le comparateur de DUBCSCQ, instrument généralement utilisé pour leur mise en oeuvre, tout en respectant les conditions opératoires de cet appareil assez primitif, ou l'interprétation personnelle joue un si grand rôle. En effet, à l'époque où le sujet était assez neuf pour inciter les chercheurs à se livrer à une étude approfondie, le photomètre n'existait pas davantage que les appareils à mesurer le pH. Nous étions persuadé que de l'exacte compréhension du mécanisme des déficiences de ces méthodes, pourrait peut-être découler le moyen d'y remédier.

CHAPITRE II

LA TECHNIQUE DE GRIGAUT et LAUDAT ET LES PRINCIPES ELEMEN- TAIRES DE LA PHOTOCOLORIMETRIE MODERNE.

Nous avons donc choisi d'étudier la technique colorimétrique exposée dans les fiches de FLEURY (6), généralement appelée à tort technique de FOLIN et DENIS. Elle consiste, après défécation au 1/2 par l'acide trichloracétique à 20% et filtration, à comparer les colorations obtenues avec ce filtrat, puis avec une solution d'acide urique, en opérant de la façon qui est résumée dans le tableau suivant, où chaque colonne verticale représente un tube dans lequel on met successivement, et dans l'ordre, les réactifs indiqués en marge.

	D	E
Filtrat	4	
Sol. étalon d'ac. urique		4
Carbonate de Na à 15 %	3	3
Eau dist.	3	3
Réactif de FOLIN	0,3	0,3

Toutes ces quantités
sont exprimées en
millilitres.

On examine ensuite les deux tubes dosage (D) et étalon (E), au comparateur de DUBOSCQ : on réalise l'identité de coloration de leurs liquides en les observant sous des épaisseurs variables. Si h est l'épaisseur (généralement fixée à 20 mm) d'étalon C mg qui donne une coloration égale à une épaisseur x de produit étudié, celui-ci contient par litre de sérum :

$$Y = \frac{C \cdot h}{x} \text{ mg d'acide urique.}$$

La composition exacte des réactifs sera aisément retrouvée dans les fiches de FLEURY (6), nous nous contenterons d'en indiquer le seul point particulier dont la connaissance soit importante pour la compréhension de cette étude : la solution étalon titre 25 mg/l d'acide urique, et elle contient pour la conservation, la moitié de son volume d'acide trichloracétique à 20%, donc son titre en acide trichloracétique est de 10 %.

On voit donc que le tube étalon qui contient 4 ml de cette solution, contient :

$$\frac{25 \cdot 4}{1000} = 0,100 \text{ mg d'acide urique.}$$

Si l'on considère le filtrat qui donne exactement la même coloration (parce qu'il renferme aussi 0,100 mg d'acide urique), il contient 50 % de sérum (défécation au 1/2), soit 2 ml, cette coloration correspond donc à une quantité d'acide urique de

$$\frac{0,100 \cdot 1000}{2} = 50 \text{ mg/l.}$$

Cet appareil est naturellement assez imprécis, de plus les résultats sont obtenus par une formule du type

$$Y = \frac{a}{x}$$

ou l'inconnue Y varie en raison inverse de la lecture x , ce qui correspond à une courbe hyperbolique, et ne se prête pas du tout à une étude commode. C'est pourquoi on s'efforça de réaliser des appareils permettant d'étudier la variation de la concentration Y en raison directe du chiffre lu, et de remplacer l'oeil de l'observateur par un instrument plus exact ; efforts qui aboutissent à la naissance de l'électrophotomètre.

La photocolorimétrie moderne est donc un procédé consistant à utiliser une réaction chimique conduisant quantitativement du corps à doser à un composé coloré, puis à étudier l'absorption d'un faisceau de lumière monochromatique par le liquide contenant ce composé coloré. On entend par lumière monochromatique, un rayonnement constitué par une seule longueur d'onde, bien qu'on doive se contenter pratiquement d'un faisceau de longueurs d'onde ne différant pas entre elles de plus de 5 à 10 $m\mu$ (bande passante). Le choix de cette longueur d'onde est déterminé par la couleur du dérivé qui manifeste une préférence nette pour la couleur complémentaire de la sienne (par exemple un composé bleu absorbera principalement la lumière rouge.) Cette absorption appréciée par un système de cellules photoélectriques, obéit aux lois de BEER-LAMBERT, qu'on peut schématiser de la façon suivante : l'absorption est proportionnelle au logarithme de la concentration des molécules colorées qui déterminent cette absorption, donc au logarithme de la concentration du corps initialement à doser et cette proportionnalité est linéaire. Pour la commodité d'expression des résultats, les concentrations sont exprimées en unités ordinaires, et c'est l'absorption, exprimée en 1/100e de Densité Optique, qui représente les unités logarithmiques, la Densité Optique étant elle-même un logarithme. Si l'on trace la courbe de l'absorption exprimée en 1/100e de DO, en fonction de certaines concentrations de corps à doser, judicieusement choisies (car il est impossible de tracer absolument tous les points), on aura donc une droite d'étalonnage où il suffira de se reporter, pour trouver la concentration d'un sérum quelconque.

Toutefois les lois de BEER-LAMBERT ne sont valables qu'entre certaines limites : lorsque la concentration augmente indéfiniment, la courbe cesse d'être droite pour s'infléchir de plus en plus. Il faut donc pour être valable, que la méthode envisagée soit telle, que les concentrations normales et pathologiques puissent être comprises dans la partie droite de la courbe, en raison de la difficulté de tracer avec précision une courbe non rectiligne entre les quelques points qu'on détermine expérimentalement.

CHAPITRE III

ADAPTATION PHOTOMETRIQUE DE LA TECHNIQUE DE GRIGAUT et LAUDAT, et ETUDE DE LA STABILITE DU REACTIF DE FOLIN et DENIS,

Pour objectiver ce qui se passe dans le comparateur, tout en respectant les conditions de travail de cet instrument, nous avons alors sous l'impulsion de M. P. AMBERT, réalisé l'adaptation photométrique suivante de l'étalonnage par le tube E :

	O	1	2	3	4	5	6	7	8
Sol. étalon à 50 mg/l		0,5	1	1,5	2	2,5	3	3,5	4
Acide trichlo. à 10 %	4	3,5	3	2,5	2	1,5	1	0,5	
Carbonate de Na à 15 %	3	3	3	3	3	3	3	3	3
Eau dist.	3	3	3	3	3	3	3	3	3
Réactif P. T.	0,3	0,3	0,3	0,3	0,3	0,3	0,3	0,3	0,3

Quantités exprimées en ml.

Le titre de la solution a été porté à 50 mg/l, sans autre modification, en sorte que le tube 8 qui en contient 4 ml, représente un sérum à 100 mg/l. On obtient donc à l'aide de quantités croissantes de cette solution, une gamme qui explore dans le détail la coloration développée par l'acide urique entre 0 et 100 mg/l, alors qu'avec un titre de 25 mg, on n'aurait pu dépasser 50 mg/l pour le sérum.

Ces quantités croissantes de solution étalon sont amenées à 4 ml à l'aide d'acide trichloracétique à 10 % (la solution étalon contenant elle-même 10 % de cet acide), de façon à respecter les conditions d'étude réalisées au comparateur, où le tube E renferme bien 4 ml de solution étalon à 10 % d'acide trichloracétique. En diluant en eau distillée, non seulement ces conditions ne seraient pas respectées, mais il n'y aurait pas une quantité égale d'acide trichloracétique dans chaque tube de la gamme, et comme il s'agit d'un acide fort, cette inégalité entraînerait une différence marquée de pH entre les tubes de cette gamme, entre ceux-ci et le tube E du comparateur, ainsi naturellement qu'avec le tube dosage. BOIVIN (1 et 2), ayant signalé l'influence du pH sur la coloration qui est d'autant plus intense que le milieu est plus alcalin, on s'exposerait alors à des erreurs. On pourra voir plus loin combien cette précaution était justifiée, encore qu'insuffisante.

Le tube O constitue un blanc contenant tous les réactifs, mais pas d'acide urique, et servira à éliminer leur influence propre sur l'absorption lumineuse. L'intensité de cette absorption sera appréciée par lecture immédiate au photolorimètre BECKMAN, écran rouge, avant la formation d'un précipité qui survient inévitablement au bout d'un temps assez court. On établit à l'aide des chiffres obtenus, une courbe d'étalonnage en fonction des quantités croissantes d'acide urique.

Le dosage sur le sérum se fait sans autre changement que de lire le résultat à l'aide du même appareil, par comparaison avec le blanc, puis à se reporter à la courbe d'étalonnage. L'appareil utilisé étant assurément plus sensible que bien des spectrophotomètres.

Nous insisterons encore sur le fait que malgré l'artifice consistant à diviser le tube étalon en 8, les conditions opératoires sont rigoureusement identiques à celles de la technique au comparateur.

Les résultats obtenus pour l'étalonnage ainsi réalisé, sont portés dans le tableau et ont été utilisés pour établir la courbe de la fig. 2. Ils ont été obtenus avec un réactif phosphotungstique fraîchement préparé. Un simple coup d'oeil permet de se rendre compte que la loi de BEER n'est pas

vérifiée sur toute l'étendue du tracé, qu'on peut seulement assimiler à une droite jusqu'à 50 mg. Toutefois avant de passer à la critique de cette notion, il convient de rapporter les constatations suivantes.

Nous avons pu observer que les différents réactifs phosphotungstiques préparés dans des conditions identiques, à partir de tungstates de bonne qualité (RP), ne présentent pas tous le même pouvoir sur le développement de la coloration due à une même quantité d'acide urique. Ceci serait dû à la présence de substances réductrices en quantités faibles, mais variables, dans les produits même très purs ayant servi à la préparation des réactifs, ces substances s'opposant à l'oxydation de l'acide urique. La préparation du réactif de FOLIN exigeant une ébullition de 1 h 1/2 à 2 h, les auteurs avaient remarqué (7) qu'au bout de 24 h d'ébullition, le pouvoir colorant du réactif était accru de 20 %, mais en égard à la complication qui en résultait, ils avaient jugé cet avantage peu intéressant. La raison en est très probablement que, comme il s'agit d'un réactif d'oxydation, il réalise en 24 h l'auto-oxydation de ses substances réductrices. Cela fournirait aussi l'explication de cette autre constatation selon laquelle le réactif phosphotungstique n'a pas une activité constante dans le temps : son activité augmente progressivement jusqu'à un maximum. Nous pensons qu'il s'agit d'une auto-oxydation, opinion renforcée par le fait qu'il ne suffit pas d'abandonner le réactif à lui-même pendant plusieurs semaines pour obtenir l'activité maximum, comme nous l'avons tenté dans le but de nous débarrasser de ce phénomène qui, s'il ne présente aucun inconvénient lorsqu'on travaille au comparateur, puisqu'on se réfère simultanément à un étalon subissant de la même manière les vicissitudes du réactif, se révèle catastrophique en photométrie absolue, ou l'on réalise une courbe d'étalonnage une fois pour toute la durée du réactif. L'oxydation des substances parasites du réactif ne se réalise à une vitesse appréciable, qu'à la suite de débouchages et pipettages répétés et quotidiens faisant intervenir l'oxygène de l'air. Dans ces conditions, on peut espérer arriver à l'activité maximum en trois semaines - un mois. C'est-à-dire qu'il faut impérativement utiliser le réactif pendant une période où il est précisément inutilisable, car il n'est pas question de refaire un étalonnage chaque jour.

Tube	ac. urique mg/l	DO en 1/100
1	12,5	7
2	25	10,5
3	37,5	15,5
4	50	19,5
5	62,5	21,5
6	75	24,5
7	87,5	24
8	100	27

Tube	DO
1	9
2	15,5
3	19,5
4	25
5	26,5
6	30
7	31,5
8	32

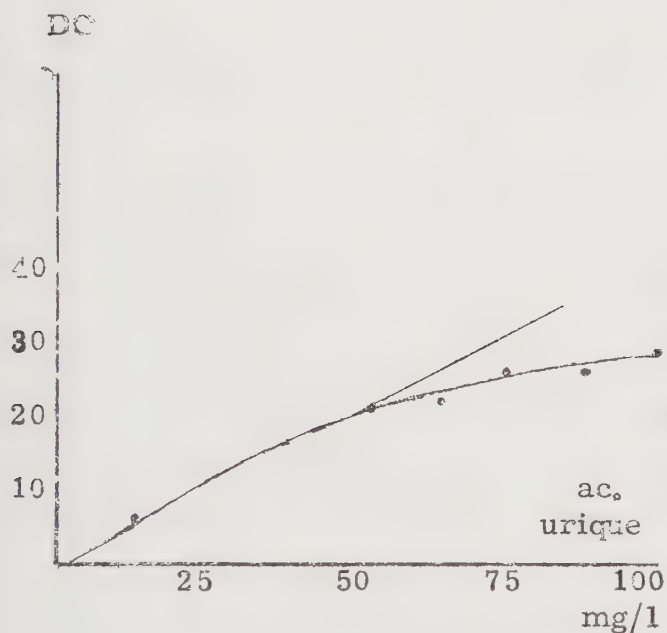


fig. 2

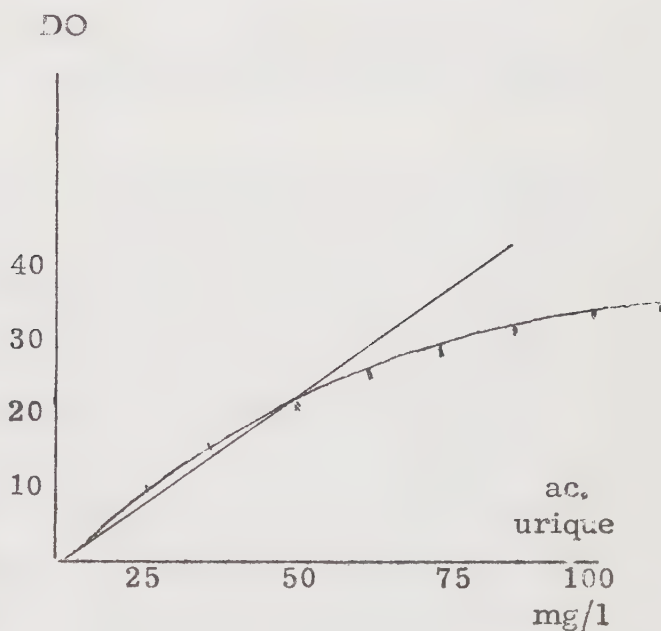


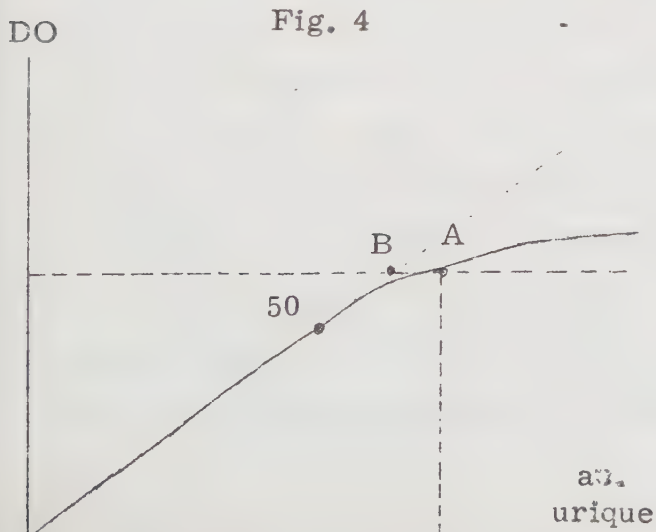
fig. 3

Nous avons alors été amené à traiter ce réactif par une ébullition de 15 minutes après addition d'un peu d'eau bromée, traitement que préconisent tous les auteurs américains relativement récents, non dans le but de pallier cet inconvénient qui ne les gênait pas puisqu'ils travaillaient aussi au comparateur, mais pour obtenir une coloration maximum.

CHAPITRE IV

LE NON RESPECT DES LOIS DE BEER-LAMBERT ET SON RETENTISSEMENT

Les résultats obtenus avec le même réactif, après traitement à l'eau bromée, sont portés dans le tableau et ont été utilisés pour établir la courbe de la fig. 3. On voit que les DO sont effectivement plus élevées pour une même quantité d'acide urique (28 % en moyenne). On voit aussi que l'approximation à une droite jusqu'à 50 mg devient plus difficile. On peut toutefois admettre qu'en travaillant avec des appareils peu sensibles et en lumière blanche, ce qui est le cas du comparateur, cette approximation est réalisable. Il découle de cela que tant que le sérum à examiner développe une coloration inférieure à celle de l'étalon (tube E), la formule du comparateur peut être appliquée, sous les réserves que nous verrons plus loin. Dans le cas où cette coloration est supérieure, le résultat sera inexact par défaut, puisqu'il faudra une épais-



seur trop grande de liquide pour réaliser l'identité des teintes, en raison de l'affaîssement de la coloration (l'acide urique, selon la formule du comparateur, varie en raison inverse de l'épaisseur). Il en irait de même pour une adaptation photométrique hasardeuse, utilisant la solution étalon à 25 mg/l décrite dans la technique originale, qui ignorant donc

l'infléchissement de la courbe au-delà de 50 mg, serait amenée à la supposer droite. Soit en effet un sérum contenant plus de 50 mg/l d'acide urique, et dont la densité optique est représentée sur la fig. 4 par une droite parallèle à l'axe des abscisses. Elle coupe la courbe réelle en A, et la droite supposée en B : les résultats lus à la verticale de B sont inférieurs à ceux qui devraient être lus à la verticale de A.

Il y a donc correspondance entre les déficiences de la courbe photométrique et celles de la mesure au comparateur. Cela tient au fait que malgré que cet appareil ne fasse en apparence appel à aucune droite d'étalonnage, il en utilise néanmoins une : celle de l'absorption de la lumière en fonction de la coloration, c'est-à-dire de la Densité Optique en fonction de la concentration.

Cette non obéissance aux lois de BEER-LAMBERT avait déjà été observée par divers auteurs : GUILLAUMIN (11), avait établi que dans les conditions où il opérait (avant la modification de LAUDAT), le point où la courbe cessait d'être droite, correspondait à 0,2 mg d'acide urique pour 25 ml, sans qu'on sache bien s'il s'agissait de 25 ml de sérum ou du volume sous lequel il pratiquait sa réaction. DELAVILLE et JONES (3) avaient même calculé un coefficient de correction à appliquer à partir de 20 mg/l. BOIVIN (1) ayant repris leurs travaux, se trouvait d'accord sur le principe, mais non sur la valeur du coefficient qu'il estimait trop élevé. Il attribuait ce fait à l'emploi par DELAVILLE d'un tungstate contenant des traces de molybdate, et réagissant par là avec d'autres substances que l'acide urique, comme nous le verrons aussi plus loin. Il pourrait peut-être s'agir en réalité de deux réactifs phosphotungstiques de vieillissement différent, car on peut voir en comparant les courbes des fig. 2 et 3, que cette dernière est plus arrondie dans sa partie initiale. Nous sommes plutôt d'accord avec DELAVILLE pour penser que c'est autour de 20-25 mg que les lois de BEER-LAMBERT cessent d'être respectées (fig. 3).

Dans le but de pallier cet important inconvénient, LAUDAT (12) conseillait en cas d'hyper-uricémie, de diluer le filtrat pour réaliser une comparaison de colorations très voisines. On peut toutefois remarquer que,

s'il est possible de diluer au $1/3$, au $1/4$, aux $3/4$, etc... il est exceptionnellement possible de réaliser l'exacte identité de coloration : ou l'on se retrouve en dessous de l'étalon et les résultats peuvent répondre à la formule du comparateur, toujours sous les réserves que nous verrons bientôt, ou l'on se retrouve au-dessus et l'on se livre encore à une sous évaluation, il est vrai plus réduite. Toutefois ceci n'est valable qu'à la condition de diluer le filtrat en acide trichloracétique à 10 %, comme nous allons le voir maintenant.

CHAPITRE V

INFLUENCE DU pH SUR LA REACTION ET SES CONSEQUENCES

On se souvient que les anciens auteurs mentionnaient l'accentuation de la coloration obtenue en milieux de plus en plus alcalins, et que c'est cette raison qui nous avait amené à diluer notre solution étalon avec de l'acide trichloracétique à 10 %. Nous nous sommes alors demandé si l'on avait porté suffisamment d'attention au fait que la défécation entraîne une consommation d'acide trichloracétique, et par conséquent une modification du pH du tube dosage par rapport au tube étalon, dans lequel cette consommation ne se produit pas. Après mesure précise au pH-mètre, les pH ont été établis à 9,1 pour le tube D et 8,7 pour le tube E, soit une différence de 0,4 unité pH. Cette différence de pH était-elle suffisante pour entraîner une différence de coloration à quantité égale d'acide urique ? Pour en avoir le coeur net, nous avons entrepris une étude de la coloration en fonction du pH, en faisant varier celui-ci à l'aide de quantités décroissantes d'acide trichloracétique. Cette manière de faire nous a paru préférable à l'addition de quantités croissantes de carbonate, d'une part parce que c'est la teneur variable en acide trichloracétique que nous incrimions, de l'autre parce que l'accroissement de la concentration en carbonate accélère la formation du précipité qui finit par devenir instantané. Le mode opératoire en 4 tubes plus un blanc (celui de la gamme) pour le tarage, est réalisé comme l'indique le tableau de la page suivante.

Les tubes sont ensuite examinés du double point de vue de la Densité Optique à l'aide du photomètre BECKMAN, et du pH avec un pH-mètre HEITO (micro-électrode). Les résultats étant rapportés dans le tableau et la courbe de la fig. 5. On remarque que ces tubes contenant 1 ml de solution étalon, correspondent au tube 2 de la gamme dont la densité optique est de 15,5 (courbe 3) pour un pH de 8,7 et qui contient 3 ml d'acide trichloracétique. Il a donc été intercalé sur la courbe entre les tubes 2 et 3 à l'étude du pH.

	0	1	2	3	4
Solution étalon		1	1	1	1
Ac. trichlo. à 10 %	4	6	4	2	
Carbonate à 15 %	3	3	3	3	3
Eau dist.	3		2	4	6
Réactif P. T.	0,3	0,3	0,3	0,3	0,3

quantités en ml.

On voit que ces points sont situés sur une droite qui exprime la variation de la coloration en fonction du pH pour une quantité d'acide urique de 25 mg/l. On voit aussi que cette variation est considérable, et que pour une différence

T	DO	pH
1	4	7
2	9,5	7,6
3	20,5	9,2
4	25,5	9,7

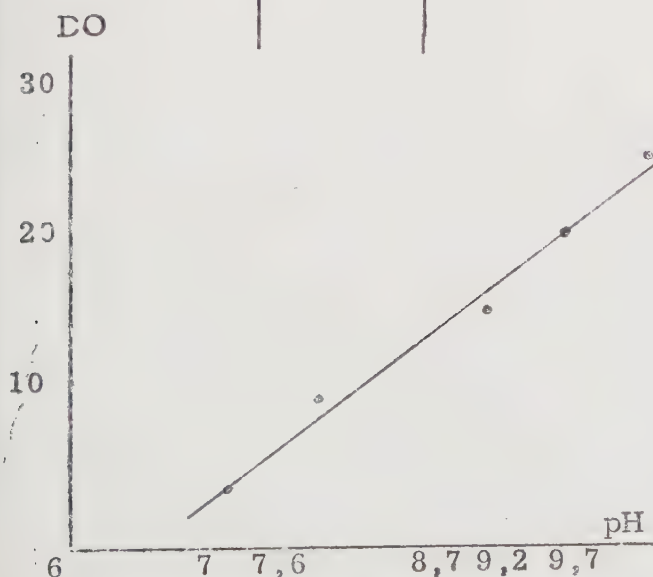


Fig. 5

de 0,4 unité pH, la différence d'absorption est de 3/100 de DO, ce qui correspond à une erreur par excès d'environ 5 mg pour 25, soit 20%. C'est en effet le tube dosage ayant le pH le plus élevé, qui est plus coloré que l'étalon correspondant. Au comparateur, sa hauteur d'égaleisation sera donc moindre qu'il ne faudrait et l'on n'a pas oublié que la concentration varie en raison inverse de la hauteur. De même lorsqu'on reporte la DO sur la courbe d'étalonnage, le résultat sera projeté au-delà de 25 mg. On remarque de plus que le tube 4 représente la dilution en

eau distillée de 1 ml de solution étalon : son pH est encore plus éloigné de celui, du dosage. Cette marge d'erreur énorme peut apparaître de prime abord comme extrêmement choquante ; elle a toutefois été confirmée par des recoupements dont certains seront utilisés plus loin. Elle est d'ailleurs parfois plus ou moins compensée par la non obéissance aux lois de BEER-LAMBERT, qui joue en sens contraire au-delà de 25, ou de 50 mg, selon la limite jusqu'à laquelle on admet l'approximation à une droite.

Si l'on joint à cela que la réaction évolue assez rapidement dans le temps, mais que la survenue d'un précipité oblige à lire les résultats le plus rapidement possible, avant l'obtention d'un certain degré d'équilibre : entre les premiers tubes traités et les derniers, on ne s'étonnera pas que les résultats obtenus soient discutables, et n'aient pas manqué d'être discutés, tant chez les sujets normaux que chez les malades.

CHAPITRE VI

LES RESULTATS OBTENUS CHEZ LES SUJETS NORMAUX ET CHEZ LES MALADES

Il nous était apparu sur un certain nombre de dosages pratiqués simultanément, que les chiffres obtenus chez les sujets normaux étaient dans l'ensemble élevés, et pratiquement jamais inférieurs à 45-50 mg/l, sans jamais descendre jusqu'à 25-30 mg, comme la possibilité en était indiquée par d'autres techniques. Ce fut d'ailleurs ce qui nous conduisit à entreprendre l'étude de la répercussion possible des différences de pH. G. FIGAUT (10), donnait déjà ces chiffres de 45-50 mg comme correspondant aux valeurs normales. DELAVILLE (4) et UZAN (15), trouvaient aussi des résultats surévalués par comparaison avec la technique au ferricyanure. Nous pensons avoir apporté l'explication du phénomène, car les autres substances présentes à l'état normal dans le sang, et susceptibles d'interférer sur les résultats, sont en quantité insuffisante pour expliquer toute la différence, à condition d'utiliser un réactif convenablement préparé, comme nous le verrons.

Il est à noter qu'à été entreprise en Scandinavie, la comparaison systématique des chiffres obtenus chez les sujets normaux, par l'uricase et par colorimétrie. Nous n'en rapporterons cependant pas les résultats, car les techniques colorimétriques utilisent à l'étranger des modalités différentes, qui restent naturellement sensibles aux mêmes influences générales, mais qui se manifestent quant au résultat avec une amplitude différente :

si l'on considère par exemple la technique de FOLIN et WU (9), on voit que la défécation tungstique que ces auteurs ont introduite en Biologie et qui donne un filtrat de défécation beaucoup moins acide, modérera les différences de pH étalon-dosage ; de même l'utilisation du cyanure de sodium dans le but d'augmenter considérablement l'intensité de la coloration, supprime peut-être cette différence (ce sel d'acide faible et de base forte ne peut manquer de posséder un certain pouvoir tampon). Les résultats de cette étude sont donc strictement applicables à la réaction considérée, dans ses modalités propres.

L'étude simultanée des résultats obtenus au comparateur, en diluant le filtrat pour se rapprocher le plus possible de la coloration de l'étalon, comme le recommandait LAUDAT, et de deux obtenus par la technique à l'uricase, a été menée par MM. VALETTE, SABEL et TARD (16), chez 70 malades atteints d'affections ostéoarticulaires, dont certains traités par le salicylate de soude, et les a amenés à définir 4 catégories :

Dans la première, les différences entre les deux techniques restent inférieures à 5 %.

Dans la 2^e, ces différences sont comprises entre 5 et 10 %.

Dans la 3^e, les différences, supérieures à 20 %, sont toutes à l'avantage de la colorimétrie. Cette catégorie renfermant tous les malades traités par le salicylate.

Dans la 4^e, les différences, supérieures à 20 %, sont à l'avantage de la technique enzymatique. Tous les malades de cette catégorie étant goutteux de façon certaine, et présentant une uricémie de l'ordre de 100 mg/l. Il est à noter que ces goutteux ne représentent que le tiers des malades examinés atteints de cette affection. Chez les autres ne se retrouve qu'une discordance inférieure à 10 %.

Il résulte d'un échange de correspondance que nous avons eu avec M. SABEL, que les discordances observées dans les catégories I et II, ne sont pas systématisées, étant tantôt à l'avantage d'une technique, tantôt de

l'autre et que tous les chiffres y sont représentés, depuis 40 mg/l, jusqu'à 128. Cela provient de ce que dans l'impossibilité de diluer de façon à égaler exactement la coloration de l'étalon, on se retrouve tantôt en-dessous, soumis uniquement à la différence de pH, tantôt au-dessus, soumis à l'opposition différence de pH-non observation des lois de BEER-LAMBERT, avec prédominance d'un terme ou de l'autre, ou même compensation exacte dans les cas heureux, et comme il est sans doute parfaitement vain d'espérer que le miracle se reproduira à chaque fois, avec des résultats absolument fantaisistes.

Il n'en reste pas moins que les catégories III et IV présentent une systématisation qui semble se dégager du hasard des combinaisons de facteurs antagonistes. Particulièrement la catégorie III, où tous les malades traités au salicylate présentent une majoration considérable de leur uricémie.

CHAPITRE VII

LE PROBLEME DU TRAITEMENT SALICYLE

On explique généralement l'action du salicylate par le fait que le réactif de FOLIN étant un réactif des phénols, agit sur l'acide salicylique qui en est un lui-même. Pourtant, en faisant la bibliographie de la question, nous avons été amenés à penser que cet acide ne devait pas réagir avec le réactif phosphotungstique : FOLIN et Mc CALLUM (8), dans un article préliminaire, décrivaient ce réactif comme agissant sur tous les corps possédant 2 fonctions hydroxy, en para. Ce n'est pas le cas de l'acide salicylique ou acide ortho-hydroxybenzoïque. FOLIN et DENIS (7), en présentant définitivement leurs deux réactifs, s'étant efforcés de séparer l'action sur l'acide urique (réactif phosphotungstique), de celle sur les phénols (réactifs phosphotungstomolybdique), se sont livrés à une étude complète du premier sur les seconds. Ils ont alors vu que leur réactif phosphotungstique ne réagissait avec aucun monophénol, et notamment pas avec l'acide salicylique, non plus qu'avec les diphénoles ne possédant pas leurs deux fonctions en para, pour réagir cependant de façon constante avec les triphénols. Ce réactif n'a non plus aucune action sur le glucose comme on est allé jusqu'à l'écrire, car s'il est possible d'utiliser le réactif phosphomolybdique pour le dosage de ce sucre, et par conséquent le réactif phospho-tungstomolybdique qui peut se former au cours d'une préparation incorrecte du réactif comme nous le verrons, il faut tout au moins traiter au préalable le filtrat par une liqueur

cupro-alcaline du type liqueur de BERTRAND, et c'est l'oxydure formé qui agit sur le réactif. Malgré cela, les observations de l'interférence du traitement salicylé sur le dosage colorimétrique de l'acide urique existent indiscutablement. Nous avons alors entrepris, après avoir préparé une solution mère d'acide salicylique à 40 g pour 100, d'en ajouter systématiquement à la réaction sous diverses modalités.

Nous avons tout d'abord remplacé le filtrat par 1 ml de solution mère plus 3 ml d'acide trichloracétique à 10 %. Il ne s'est développé absolument aucune coloration, même pour le photomètre. Nous nous sommes alors demandé si, tout en étant incapable de réagir avec le réactif, l'acide salicylique n'avait pas comme le cyanure, la propriété d'augmenter l'intensité de la coloration donnée par une quantité déterminée d'acide urique. Nous avons alors réalisé la réaction en trois tubes contenant une même quantité d'acide urique provenant d'un sérum quelconque, le 1° ne contenant pas d'acide salicylique, les deux suivants en contenant une quantité égale, mais ajoutée au filtrat pour le 2°, au sérum avant défécation pour le 3°. Il a donc fallu après avoir préparé deux solutions filles d'acide salicylique à 0,40 et 0,80 g/l, réaliser deux défécations : la première normale avec de l'acide trichloracétique à parties égales, donnant le filtrat n°1, la deuxième comme indiqué ci-dessous, donnant le filtrat n°2.

Sérum	3 ml
Acide salicylique à 0,80/1	1 ml
on a laissé incubé 10 ⁱ avant d'ajouter	
Ac. trichloracétique à 20 %	4 ml

Les modalités de l'opération sont résumées dans le tableau suivant, ainsi que les résultats, le tube O représentant le blanc. (Lecture au photomètre BECKMAN, écran rouge).

0 1 2 3

Filtrat 1

Filtrat 2

Ac. salic. à 0,40/l

Ac. trichlo. à 10 %

Carbonate à 15 %

Eau dist.

Réactif P. T.

	3	3	
			4
		1	
4	1	1	
3	3	3	3
3	3	2	3
0,3	0,3	0,3	0,3

T	DO	pH
1	26,5	8,9
2	26	8,9
3	27,5	9

Quantités en ml.

On voit que par le jeu des différentes quantités de réactifs et de la défécation particulière, le sérum se trouve dilué aux 3/4 partout, chaque tube contenant une quantité égale d'acide urique. De même, les deux derniers tubes contiennent tous les deux 0,400 mg d'acide salicylique, correspondant à une salicylémie de 200 mg/l. Chacun des trois tubes devait théoriquement contenir une quantité égale d'acide trichloracétique, mais il s'est révélé impossible d'en simuler exactement la consommation au cours de deux défécations dissemblables, en sorte que le pH du tube 3 est légèrement plus élevé. Dans ces conditions, la coloration obtenue dans les trois tubes (exprimée par sa Densité Optique), est identique : la différence d'un demi centième de DO entre 1 et 2 représentant l'erreur possible de lecture (une graduation du cadran), par ailleurs si l'on se reporte à la courbe de la fig. 5, le calcul théorique fait à partir de la différence de pH de 0,1 unité, qui correspond à une différence de 1/100 de DO pour 15,5 (tube gamme), donne pour le tube 3 une DO de :

$$\frac{27,5 - 15,5}{16,5} = 25,8 \text{ pour un pH de } 8,9.$$

Une autre expérience moins équilibrée du point de vue du pH, où les tubes 1 et 2 ne recevaient pas d'acide trichloracétique en plus du filtrat, donnait en 2 une DO de 32 pour un pH de 9,35 et en 3 évidemment toujours une DO de 27 (erreur possible de lecture) pour un pH de 9. Le calcul théorique ramène la DO de ce dernier tube à 32,2 pour un pH de 9,35.

On voit donc que l'acide salicylique n'exerce bien par lui-même aucune interférence sur la réaction. Il y a alors deux explications possibles. La première est basée sur l'existence du 2^e réactif de FOLIN et DENIS, dit réactif des phénols, à la fois phosphotungstique et phosphomolybdique, qui réagit, on ne l'a pas oublié, avec l'acide salicylique. Or il existe dans certains tungstates de Na, des traces de molybdate donnant évidemment naissance à de l'acide phosphomolybdique très actif. Nous n'avons pas voulu, en raison de la longueur de leur préparation, réaliser divers réactifs à l'aide de tous les tungstates réputés satisfaisants (car nous ne prétendons nullement accuser d'ignorance ou de négligence les auteurs en question ; il nous paraît plus probable que leur bonne foi ait pu être surprise par un fabricant leur ayant livré des échantillons de qualité insuffisante ou irrégulière), en raison aussi de ce qu'on peut éviter cet écueil dont la possibilité est connue, par l'emploi d'un tungstate convenable. Aussi bien d'ailleurs en cas d'emploi de la défécation tungstique, car l'acide phosphomolybdique se forme même à froid, en présence de l'excès d'acide phosphorique du réactif. Nous rappelons que c'est déjà à l'emploi par DELAVILLE d'un tungstate insuffisamment purifié, que BOIVIN attribuait les résultats différents qu'il obtenait dans le calcul d'un coefficient de correction.

Nous avons nous-même utilisé du tungstate Prolabo RP qui s'est trouvé exempt de molybdate, sans que nous puissions garantir qu'il en est constamment ainsi. Nous avons essayé de reprendre l'expérience précédente avec un réactif préparé à l'aide d'un tungstate de qualité notoirement insuffisante, ne contenant plus des traces, mais des quantités appréciables de molybdate. Nous avons alors obtenu des DO semblables pour tous les tubes, mais tellement élevées, qu'elles se rapportent à une portion de la courbe

qui doit être quasiment horizontale, donc dans une zone où un accroissement de concentration n'est pas susceptible d'entraîner une augmentation de DO, ce qui prouve d'ailleurs aussi que ce réactif insatisfaisant dose bien autre chose que l'acide urique puisque la DO du tube 1 qui ne contient pas d'acide salicylique est alors normalement élevée. On peut d'ailleurs se demander si l'oxydation par le brome ne joue pas un rôle dans l'insensibilité du réactif vis à vis du salicylate.

La deuxième explication tient compte des modifications que l'organisme est susceptible de faire subir à l'acide salicylique. On sait que chez le rat, cet acide est déttoxiqué et éliminé sous forme d'acide gentisique ou acide 2-5 di-hydroxybenzoïque, qui est un para-diphénol. En est-il de même chez l'homme ? Et quelles en sont les conséquences ? Pour nous en rendre compte sans recourir à la comparaison avec une autre technique, qui est nous l'avons vu irréalisable, nous avons réalisé la réaction après traitement par l'uricase, sur du sérum de sujet ayant absorbé du salicylate de soude. Cette expérience a été menée sur nous-mêmes de la façon suivante : après un traitement de trois jours consécutifs par un salicylate pur (Enterosalicyl) à la dose quotidienne de 4g, notre sérum a été mis en contact pendant 24 h avec 100 unités PRAETORIUS d'uricase Eurobio, dans les proportions indiquées ci-dessous :

Sérum	2 ml
Uricase dissoute dans tampon	
glycocolle	2 ml

de façon à détruire totalement l'acide urique. Puis le mélange a été déféqué par 4 ml d'acide trichloracétique à 20 %, comme s'il représentait du sérum pur, et le filtrat de défécation a subi la réaction de GRIGAUT et LAUDAT, dans ses modalités habituelles.

Il ne s'est développé qu'une coloration extrêmement faible, à peine visible dans l'axe du tube, qui a été évaluée par le photomètre comparative-ment au blanc de la gamme étalon à 1/100 de DO, soit 2/100 pour 4 ml de sérum, pour un pH de 8,8 au lieu de 9,1 pour la réaction habituelle, car le défaut de consommation d'acide trichloracétique par une quantité deux fois moindre de sérum, n'a été que médiocrement compensé par l'addition de

2 ml de solution d'uricase en tampon à pH 9,3. Cette différence de pH de 0,1 unité avec la gamme (pH 8,7), entraîne une différence de 1/100 de DO environ, pour 15,5 (fig. 5). La DO réelle de notre sérum ainsi traité doit être évaluée à

$$\frac{2 \cdot 14,5}{15,5} = 1,9/100 \text{ pour un pH de } 8,7$$

correspondant sur la courbe de la fig. 3 à environ 2,5 mg/l d'acide urique.

On voit donc que même in vivo l'acide salicylique n'exerce aucune influence sur le dosage : ces 2,5 mg/l correspondant à une équivalence en acide urique vrai, après correction de pH, représentent l'erreur due aux substances aberrantes du sérum, qui peuvent en imposer pour cet acide. On voit aussi que cette erreur est faible (elle représente pour une uricémie de 50 mg/l une erreur de 5 %) et compatible avec la marge tolérée en photométrie. Tous les auteurs américains qui ont étudié l'action de ces substances (sans correction de pH, toutefois), trouvent des chiffres à peine supérieurs.

CHAPITRE VIII

L'ACIDE URIQUE DES GOUTTEUX.

Reste maintenant le problème de l'acide urique des goutteux. Pour expliquer le fait que chez le tiers de ceux-ci l'acide urique était sous évalué par la méthode colorimétrique, MM. VALETTE, SABEL et TARD (16) ont émis l'hypothèse que chez ces malades, l'acide urique se trouverait sous un état physico-chimique spécial inaccessible à une oxydation non enzymatique. Sans vouloir nier l'existence d'un état particulier de l'acide urique chez les goutteux, qu'on pourrait peut-être soupçonner d'après certaines constatations telles que le ralentissement de son oxydation par les éléments figurés du sang, nous pensons que les comparaisons qui ont été effectuées ne sont nullement de nature à le prouver. Nous avons vu en effet, que si les résultats donnés par la méthode à l'uricase sont parfaitement valables, il n'en va pas de même de ceux qui sont obtenus par cette technique colorimétrique, qui sont répartis avec la plus grande fantaisie autour de la valeur réelle, en raison du jeu de facteurs antagonistes se combinant au hasard des dilutions effectuées.

Cet état particulier de l'acide urique ne le rendrait d'ailleurs pas obligatoirement inaccessible à une oxydation non enzymatique. Un certain nombre de raisons militeraient plutôt en sens contraire.

C'est seulement chez le tiers des goutteux examinés, que l'acide urique refuserait de se laisser oxyder par le réactif de FOLIN : il y aurait

donc deux gouttes avec deux sortes d'acide urique pathologique, donc trois variétés d'acide urique si l'on tient compte de la variété normale ? Et encore chez ce tiers d'infortunés seule une partie de cet acide marquerait une telle mauvaise volonté : les 20 % qui font la différence avec la technique à l'uricase. Possèderaient-ils donc en même temps deux variétés pathologiques d'acide urique ? On pourrait évidemment envisager la possibilité selon laquelle ils possèderaient à la fois de l'acide urique normal et de l'acide urique particulier à leur maladie, ce qui ramènerait à deux le nombre des variétés d'acide urique, mais alors les deux tiers des malades restant ne possèderaient que de l'acide urique normal oxydable par des moyens ordinaires, et si la goutte consistait précisément en la production d'un acide urique ayant entre autres propriétés celle de résister à l'action du réactif de FOLIN, ne serait-on pas amenés à penser que ces malades sont en réalité des biens portants ?

D'autre part, il peut paraître bizarre qu'un réactif d'oxydation assez énergique ait une action moins intense qu'un enzyme. Ce qu'on sait des réactions enzymatiques de dégradation conduit à penser qu'elles sont utilisées uniquement dans le but de réaliser avec ménagement, dans des conditions de pH et de température compatibles avec la vie, des réactions que nous réalisons in vitro avec la brutalité de nos moyens relativement grossiers : combinaison explosive de l'hydrogène et de l'oxygène sous l'effet de l'étincelle électrique dans l'eudiomètre, combustion du carbone par le feu, etc... La supériorité de l'enzyme de dégradation résidant plutôt dans la douceur et la spécificité de son action, que dans son énergie. D'ailleurs, si l'on veut bien considérer l'oxydation de l'acide urique du sujet normal (réputé dosable par le procédé), par le réactif de FOLIN, on s'aperçoit que la réaction est pratiquement instantanée, alors que chez le même sujet normal, l'oxydation par l'uricase est lente et progressive, il faut en effet la surveiller de 5' en 5', ce qui ne plaide pas en faveur de l'action plus énergique de l'enzyme. De plus, si l'action de l'enzyme est spécifique, le réactif de FOLIN aurait plus tendance à ne pas limiter son action à l'acide urique, qu'à l'oxyder incomplètement.

Cette hypothèse d'un état particulier de l'acide urique dans la goutte n'est pas nouvelle. Vue sous un autre angle, elle avait été rappelée par

MM. PAILLARD et FAUVERT (13) :

elle était alors considérée comme ayant le mérite d'expliquer la précipitation tissulaire de l'acide urique chez les goutteux, lors même d'une hyper-uricémie le plus souvent modérée, tandis qu'on n'observe jamais ce phénomène dans les hyper-uricémies non goutteuses, dont les auteurs rappelaient aussi qu'elles sont fréquentes, et même souvent à des taux plus élevés. Ils rappelaient aussi que (même en dehors de caractères particuliers d'oxydabilité qui n'étaient pas évoqués), rien ne permettait de conclure à l'existence d'un état spécial de l'acide urique dans la goutte.

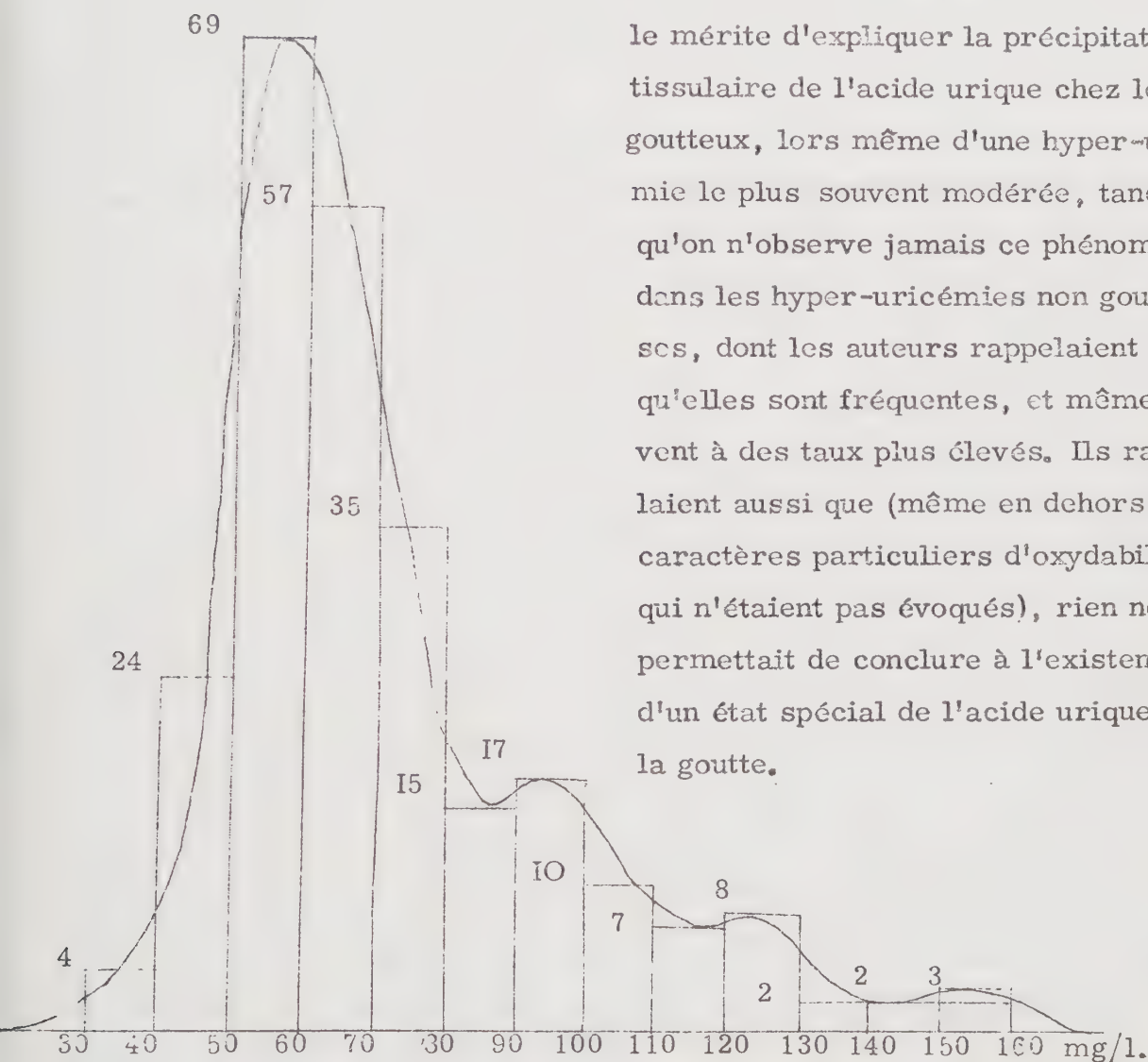


Fig. 6

Ces mêmes auteurs présentaient aussi 542 malades atteints de goutte aiguë, parmi lesquels 254 chez qui l'acide urique avait pu être dosé, précisément par la technique de GRIGAUT et LAUDAT, par les mêmes chimistes et affirment-ils dans les mêmes conditions, ce qui dans leur esprit devait rendre les résultats comparables entre eux, même si la technique présentait des déficiences qui n'avaient pas échappé à leur attention.

Nous avons dressé à l'aide des chiffres fournis par eux, une courbe statistique de GAUSS (fig. 6) exprimant le nombre de cas où un même chiffre d'acide urique a été rencontré (chaque colonne verticale représente en réalité le nombre de chiffres d'acide urique compris entre une dizaine de mg/l et la dizaine de mg suivante). On y voit tout d'abord que si l'on admettait les chiffres comme valables (ce qu'on ne peut plus penser à la lumière des déficiences de la technique), leur conclusion selon laquelle on trouverait une hyperuricémie dans 91 % de cas de goutte non tophacée, semblerait un peu excessive : le maximum de fréquence se situant entre 50 et 60 mg/l, les idées actuelles sur la valeur de l'uricémie normale donnent plutôt à penser qu'il s'agirait là de chiffres normaux, car l'acide urique surtout par la technique envisagée, paraît supérieur aux 40-45 mg/l que les auteurs donnent pour limite. On voit aussi que la courbe présente quatre pics successifs qui ne représentent sûrement pas quatre espèces différentes de goutte, mais traduisent plutôt le fait que les différents sérums n'ont pas du tout été traités de la même façon, malgré l'emploi d'une même technique par les mêmes techniciens. Nous avons vu que la nécessité de diluer de façon variable les filtrats au fur et à mesure que la coloration s'accroît, entraîne la mise en jeu d'un équilibre différent des facteurs antagonistes auxquels obéit la réaction, chaque cloche correspondant alors probablement à un traitement différent du filtrat : la 1^{re} représentant probablement l'examen du filtrat pur, et chacune des suivantes une dilution de plus en plus poussée. Nous croyons que c'est ce genre de faits qui entretiennent la confusion, et justifient les opinions opposées et irréconciliables des spécialistes de la maladie, au sujet de l'hyper-uricémie dans la goutte aiguë.

L'étude comparative des sérums gouteux, qui n'est pas réalisable à l'aide de la seule technique colorimétrique par utilisation d'artifices internes comme ceux qui ont été employés pour le traitement salicylé, ne pourrait être entreprise qu'à l'aide d'une technique débarrassée des défauts qui aboutissent à des résultats pratiquement dus au hasard : en répartissant de façon quelconque en trois catégories (I, II et IV) un nombre suffisamment

goutteux, on doit aboutir à un classement par tiers, et il est troublant de voir que la catégorie IV envisagée est effectivement formée du tiers de ces malades, même si les deux autres catégories ne se partagent pas également le reste, peut-être en raison du nombre trop réduit de cas étudiés par MM. VALETTE, SAVEL et TARD (relativement à l'application de la loi des séries).

Une technique colorimétrique valable devrait donc obéir aux impératifs suivants :

- Utiliser un sérum suffisamment dilué pour opérer dans la zone où les lois de BEER-LAMBERT sont vérifiées, tout en obtenant une coloration suffisamment intense pour avoir une bonne appréciation des chiffres compris entre 30 et 50 mg/l.
- S'effectuer en milieu tamponné, pour éviter les différences de pH.
- Utiliser un réactif phosphotungstique stable d'emblée, préparé à partir d'un tungstate suffisamment pur pour se débarrasser des influences parasites.
- Abandonner autant que possible le carbonate de Na, pour éviter les précipitations qui gênent la lecture des résultats.

Une telle technique semble avoir été mise au point à l'heure actuelle et paraît devoir donner satisfaction. Toutefois, nous n'en parlerons pas dans ce travail en raison du recul nécessaire pour pouvoir la juger objectivement et de l'étude comparative à entreprendre avec la technique à l'uricase chez les sujets normaux, chez les malades traités par le salicylate, et chez les goutteux, car les déboires de la technique colorimétrique de dosage de l'acide urique, depuis maintenant cinquante ans que la possibilité en est connue, doivent inciter à la plus grande prudence.

CONCLUSION

Depuis la description par FOLIN et DENIS, en 1912, de leur réactif, il a semblé possible de doser l'acide urique du sang par un procédé colorimétrique, dont la variété utilisée en France est due à GRIGAUT et LAUDAT. Cette méthode représente sûrement, et de loin la technique la plus utilisée dans notre pays, malgré les déficiences déjà signalées. Nous pensons avoir montré qu'on obtenait grâce à elle des résultats fantaisistes, en raison de la combinaison variable et imprévisible des facteurs antagonistes, tels que le non respect des lois de BEER-LAMBERT, et la différence de pH qui existe entre le dosage et l'étalement de la réaction, et qu'elle devrait être abandonnée. Nous pensons aussi avoir montré que certains reproches à elle adressés, comme l'action du traitement salicylé, celle des constituants normaux du sang autres que l'acide urique susceptibles de réagir avec le réactif, dont la quantité est trop faible pour fausser réellement les résultats, comme peut être aussi l'inaptitude à doser l'acide urique des goutteux, étaient immérités, bien que cela ne semble pas devoir atténuer la condamnation qu'on se voit obligé de porter à son encontre.

La connaissance exacte de ces déficiences, ainsi que celle de l'absence de fondement de certains reproches qui avaient été faits, laisse cependant l'espoir d'édifier une méthode photolorimétrique valable dont l'étude est poursuivie avec, nous l'espérons, de bonnes chances de succès.

Vu, le Président de Thèse

Vu, le Doyen de la Faculté

Professeur R. FAUVERT

Professeur L. BINET

Vu et Permis d'imprimer
Le Recteur de l'Académie de Paris

J. ROCHE

BIBLIOGRAPHIE

1. BOIVIN A. - Dosage colorimétrique de l'acide urique en milieu faiblement alcalin. C. R. Soc. Biol. 1926 95 485
2. BOIVIN A. - Recherche sur le dosage de l'acide urique par micro-analyse. Bull. Soc. Chim. Biol. 1927 9 162
3. DELAVILLE M. et JONES Ch. - Dosage de l'acide urique dans le sang. Bull. Soc. Chim. Biol. 1925 7 785.
4. DELAVILLE M. et LESCAROUX A. - Dosage volumétrique de l'acide urique dans le sang et dans les humeurs. Ann. Biol. Clin. 1943 1 8.
5. FAUVERT R. et HARTMANN L. - Techniques modernes de laboratoire, 3^e édition. Paris 1961-62, Expansion Scientifique Française, édit. p. 161.
6. FLEURY P. - Fiches techniques de chimie biologique. Paris, Véga édit. Sang n° 8.
7. FOLIN O. and DENIS W. - On phosphotungstic-phosphomolybdic compounds as color reagents. J. Biol. Chem. 1912 12 239.
8. FOLIN O. and Mc CALLUM A. B. - On the blue color reaction of phosphotungstic acid with uric acid and others substances. J. Biol. Chem. 1912 11 265
9. FOLIN O. and WU HSIEN. - A system of blood analysis J. Biol. Chem. 1919 38 81.
10. GRIGAUT A. - Procédé colorimétrique de dosage de l'acide urique dans le sang. C. R. Soc. Biol. 1920 83 1273.
11. GUILLAUMIN Ch. O. - Sur l'acide urique sanguin. Bull. Soc. Chim. Biol. 1922 4 177.
12. LAUDAT M. - Méthode d'analyse permettant d'établir la formule azotée du sérum sanguin. Bull. Soc. Chim. Biol. 1927 9 143.
13. PAILLARD H. et FAUVERT R. - La goutte. Etude clinique anatomique et biologique. Paris 1945, J B. Baillière et Fils édit.

14. SAVEL J. - Résultats obtenus et problèmes soulevés par la détermination de l'uricémie à l'uricase, Ann. Biol. Clin. 1960 1-2 61.
15. UZAN A. - Etude de la méthode de DELAVILLE et LESCAROUX pour le dosage de l'acide urique du sérum sanguin, Ann. Biol. clin. 1956 7 à 9 594.
16. VALETTE G. SAVEL J. et TARD A. M. - Valeurs comparées de l'uricémie déterminées par oxydation chimique et enzymatique, Ann. Biol. Clin. 1958 3-4 217.

TABLE DES MATIERES

CHAPITRE I

Généralités sur les méthodes de dosage de l'acide urique dans le sang	3
--	---

CHAPITRE II

La technique de GRIGAUT et LAUDAT, et les principes élémentaires de la photolorimétrie moderne	6
---	---

CHAPITRE III

Adaptation photométrique de la technique de GRIGAUT et LAUDAT, et étude de la stabilité du réactif de FOLIN et DENIS	9
--	---

CHAPITRE IV

Le non respect des lois de BEER-LAMBERT et son retentisse- ment,.....	13
--	----

CHAPITRE V

Influence du pH sur la réaction, et ses conséquences	16
--	----

CHAPITRE VI

Les résultats obtenus chez les sujets normaux et chez les malades	19
--	----

CHAPITRE VII

Le problème du traitement salicylé	22
--	----

CHAPITRE VIII

L'acide urique des goutteux	28
-----------------------------------	----

<u>CONCLUSION</u>	33
-------------------------	----

